

特集①

遺伝子サイレンシング研究の動向



ライフサイエンス・医療ユニット 伊藤 裕子

1. はじめに

ゲノム研究の進展によって、DNA マイクロアレイなどを用いて、一度に多くの遺伝子の発現や抑制の状態を知ることができるようになってきた。その結果、生体内の全ての細胞で同じように全ての遺伝子が発現しているのではなく、細胞ごとに遺伝子の発現パターンが異なることがわかってきた。皮膚の細胞と肝臓の細胞では、発現している遺伝子が異なっている。このことは、生体内に遺伝子の発現を調節するメカニズムが存在することを示している。

がん疾患において、がんが発生した組織や臓器のがん細胞と正常細胞を比較すると、正常の細胞では発現が抑制されている遺伝子が、がん細胞では発現し、逆に正常細胞では発現している遺伝子が、がん細胞では抑制されていることが報告されている。このように、遺伝子発現の異常とがんの発症は関連があると考えられている。また、がん以外の多くの生活習慣病（糖尿病など）においても、遺伝子の発現と抑制の異常が疾病の発症に関係があることが示唆されている。

遺伝子の発現と抑制のメカニズムの解明は、近年、目覚ましく発展している研究領域である。中で

図表1 遺伝子サイレンシング研究領域に含まれる研究内容

研究対象	主な研究内容
ゲノム DNA 自体の変化を伴わない遺伝子発現の抑制メカニズム	DNA メチル化、 クロマチン修飾、 染色体の構造変化、 RNA 干渉 (RNAi)、siRNA 核酸化合物による遺伝子発現抑制等

科学技術動向研究センターにて作成

も遺伝子抑制のメカニズムの解明は、「遺伝子サイレンシング研究 (gene silencing)」と呼ばれており、ゲノム DNA 自体の変化（変異）を伴わないで生じる遺伝子抑制を研究対象にしている。

遺伝子サイレンシング研究の領域に含まれる研究内容は、図1に示すように、DNA メチル化、クロマチン修飾、染色体の構造変化、RNA を介した遺伝子の発現抑制 (RNA 干渉) など多岐にわたる¹⁾。

遺伝子抑制のメカニズムの解明研究が盛んになった理由は、遺伝子の発現を自由に制御できるような技術の開発は、様々な疾病の治療を可能とする新薬の開発につながるかと期待されたことによる。

現在、遺伝子の発現を抑制するために、人工的に合成した核酸化合物を細胞内に導入して、遺伝子の転写や翻訳を物理的に阻害することが行われている。代表的な核

酸化合物は、一本鎖の合成 DNA や RNA および RNA 酵素 (リボザイム) である。近年は、遺伝子の抑制効果が高かつ安定であるとされる「小さな二本鎖 RNA」が注目を集めている。

「小さな二本鎖 RNA」の遺伝子抑制メカニズムは、これまでの核酸化合物による抑制メカニズムとは異なり、生体内に存在する遺伝子抑制メカニズムを利用していることが近年報告された。これによって、遺伝子抑制のメカニズムの解明研究は進展し、「遺伝子サイレンシング」研究領域は拡大した。

本論では、遺伝子サイレンシング研究領域の研究動向を、小さな二本鎖 RNA のメカニズムの研究を中心に解説し、さらに医薬品開発に向けての遺伝子サイレンシング研究領域の将来性について考え、当該領域の更なる発展のための方策を検討する。

2. 遺伝子サイレンシング研究の変遷 (1990 年～2001 年)

本節では、1990 年に初めて「遺伝子サイレンシング」という現象が報告されてから、2001 年までの約 10 年間の遺伝子サイレンシング研究（基礎研究）について簡単に解説し、本研究領域のブレークスルーとなった研究を示す。

2 - 1

遺伝子サイレンシング研究は植物から始まった

遺伝子の発現が抑制される現象は「遺伝子サイレンシング (gene silencing)」と呼ばれ、この最初の例は 1990 年に植物において報告された^{2, 3)}。

これは偶然に近い形で発見された。濃い色の花を人工的に作成するためにペチュニアに紫色の色素合成に関与する遺伝子を導入したところ、予想に反して白色の花が得られた。これは、遺伝子導入によって過剰発現した遺伝子が、元来保持していた色素遺伝子の発現を抑制したと考えられた。

その後、この遺伝子サイレンシングのメカニズムの研究が続けられ、これは DNA が抑制された結果ではなく、RNA が抑制されたことによる可能性が示唆された。

2 - 2

二本鎖 RNA による遺伝子サイレンシング研究が線虫で始まった

外部から導入した一本鎖 RNA が細胞内の遺伝子発現を抑制できることは、1985 年に報告⁴⁾されていたが、二本鎖 RNA が遺伝子抑制に直接関与していることが明らかにされたのは 1998 年である。

線虫の細胞中に 300k 塩基以上

の大きな二本鎖 RNA を導入したところ、一本鎖 RNA を導入した時に比較して、より選択的かつ効率的に遺伝子抑制が生じることがわかった^{5, 6)}。

この二本鎖 RNA による遺伝子の発現抑制の現象は「RNAi (RNA interference、RNA 干渉)」と名付けられ、ヒドラ、ショウジョウバエなどの無脊椎動物や植物において観察されることが報告された。

一本鎖 RNA による遺伝子抑制は、一本鎖 RNA が標的の mRNA に結合して物理的にタンパク質への翻訳を阻害することにより生じるが、二本鎖 RNA による遺伝子抑制は、生体内に元々存在していたが、これまで知られていなかった遺伝子サイレンシング機構を利用して、遺伝子抑制を行うところにメカニズム上の違いがある。このメカニズムに関しては 2 - 5 で解説する。

2 - 3

遺伝子サイレンシングの実行役は小さな RNA であることがわかった

植物や線虫の細胞に導入された大きな二本鎖 RNA は、細胞内で 22 塩基程度の小さな二本鎖 RNA に分解され、この小さな二本鎖 RNA が遺伝子サイレンシングを起こすことが、1999 年から 2000 年に相次いで報告された。

さらに、二本鎖 RNA の分解を行う酵素が 2001 年にショウジョウバエにおいて発見され、ダイサー (Dicer) と名付けられた⁷⁾。後に、哺乳類細胞もダイサーをもつことが明らかにされた⁸⁾。

この酵素の発見により、二本鎖

RNA による遺伝子抑制は、生体に共通な生命現象であることが推定され、細胞内で実際に機能する小さな二本鎖 RNA の探索が開始された。

2 - 4

哺乳類でも小さな二本鎖 RNA 導入で遺伝子サイレンシングが生じた

当初、哺乳類の遺伝子サイレンシングのメカニズムは、線虫や植物などの無脊椎動物とは異なるため、二本鎖 RNA による遺伝子抑制は哺乳類の細胞には利用できないと考えられていた。なぜなら、30 塩基以上の長い二本鎖 RNA を哺乳類の細胞に導入すると、細胞はウイルスが侵入したと認識してインターフェロンを誘導し、遺伝子抑制ではなく、細胞死を引き起こしたからである。

しかし、線虫や植物の遺伝子サイレンシング研究の結果に基づき、大きなサイズの二本鎖 RNA を細胞に導入するのではなく、ダイサーによって分解された後と同様なサイズの 21 塩基の小さな二本鎖 RNA を哺乳類細胞へ導入することが試みられた。その結果、小さな二本鎖 RNA は、ヒト細胞を含んだ様々な哺乳類の培養細胞に対して、細胞死を起こすことなく、遺伝子サイレンシングを起こすことが見出された⁹⁾。

この発見は哺乳類に対する二本鎖 RNA の利用のブレークスルーであり、小さな二本鎖 RNA (small interference RNA、siRNA) は遺伝子の発現抑制をおこすために広く利用可能なツールとして急速に注目されるようになった。

2 - 5

二本鎖 RNA による
遺伝子サイレンシングの
メカニズム

図表 2 に二本鎖 RNA による遺伝子サイレンシングのメカニズムを示した。これは哺乳類を含めた全ての生物に共通なメカニズムであると考えられている。

- ①細胞中の二本鎖 RNA は、ダイサーにより約 22 塩基の小さな断片に切断され、小さな二本鎖 RNA (siRNA) を生成する。
- ②この siRNA の一方の RNA 鎖は RISC 複合体 (RNA-induced silencing complex) と結合し、もう一方の RNA 鎖は分解される。
- ③RNA と結合した RISC 複合体は、その RNA 鎖と相補的な配列を持つメッセンジャー RNA に結合して、その配列部分を分解し、その結果、タンパク質合成は阻害されることが考えられている。

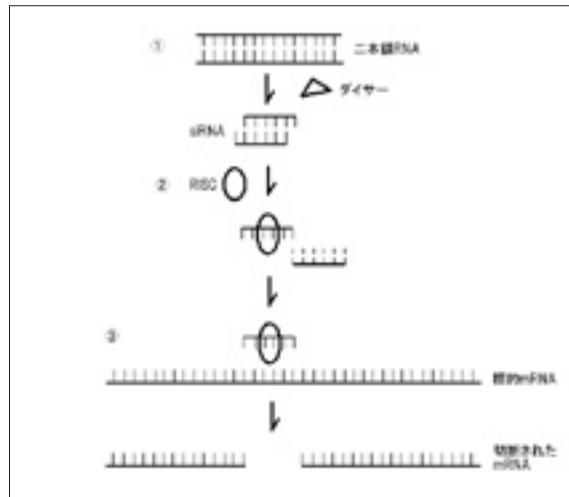
2 - 6

生体内の遺伝子発現の制御に
関与している小さな RNA

近年、小さな RNA が、実際に細胞内に多数存在し、遺伝子の制御に関わっていることが明らかになってきた。

これは miRNA (micro RNA) と呼ばれ、2001 年に報告された¹⁰⁾。二次構造としてヘアピン構造をとる RNA (疑似二本鎖) がダイサーによって切断された結果で生じた 18 から 25 塩基の短い二本鎖 RNA であり、mRNA のタンパク質非翻訳領域に相当する部分から

図表 2 二本鎖 RNA による
遺伝子サイレンシングのメカニズム



科学技術動向研究センターにて作成

図表 3 遺伝子サイレンシング研究 (基礎研究) におけるブレイクスルー

年	内容	研究対象	注目点
1990 年	遺伝子導入による花の色の遺伝子抑制	植物	遺伝子導入による表現形質変化の発見
1998 年	二本鎖 RNA (siRNA) による遺伝子抑制	線虫	新しい遺伝子抑制技術の発見
2001 年	生体内で二本鎖 RNA (siRNA) を分解する酵素 (ダイサー) の発見	ショウジョウバエ	遺伝子抑制のメカニズムの解明
2001 年	小さな二本鎖 RNA による哺乳類細胞の遺伝子抑制	哺乳類	哺乳類細胞における遺伝子抑制技術の発見
2001 年	遺伝子発現の調節を行うと推定される小さな二本鎖 RNA (miRNA) の発見	哺乳類	生体内での遺伝子発現調節に重要な分子の発見

科学技術動向研究センターにて作成

構成される。

この miRNA は、siRNA と同様なメカニズムで遺伝子の抑制を行うが、標的である mRNA 配列に完全に結合する siRNA に対して、miRNA は標的の mRNA には部分的にしか結合しないので、mRNA は分解されることはなく、物理的にタンパク質の阻害を引き起こすと考えられている。また、miRNA は、非翻訳領域の mRNA を標的にしているため、遺伝子発現の調節に関与する領域に結合して影響を与えられている。

線虫や植物の細胞には、数百個の miRNA が存在し、その役割として、発生のタイミングや幹細胞の制御を行うなどの報告がある。一方、ヒトの細胞にも miRNA は 200 個から 250 個存在するという予測がでており¹¹⁾、その機能の探索研究が盛んに行われている。

図表 3 に、遺伝子サイレンシング研究におけるブレイクスルー研究を年代順に並べた。ブレイクスルー研究が、2001 年に集中している。

3. 遺伝子サイレンシング研究領域の全体像

Thomson Scientific 社は、保有する Essential Science Indicators (ESI) という論文データベースを基に、特定の研究領域に関する論文分析を行っている。2003 年 12 月には、遺伝子サイレンシング研究領域についての分析結果が報告された¹²⁾。

本章では、Thomson Scientific 社の報告に加えて、ESI 論文データベースを利用した独自の調査結果を基に、遺伝子サイレンシング研究領域の全体像を明らかにする。

3 - 1

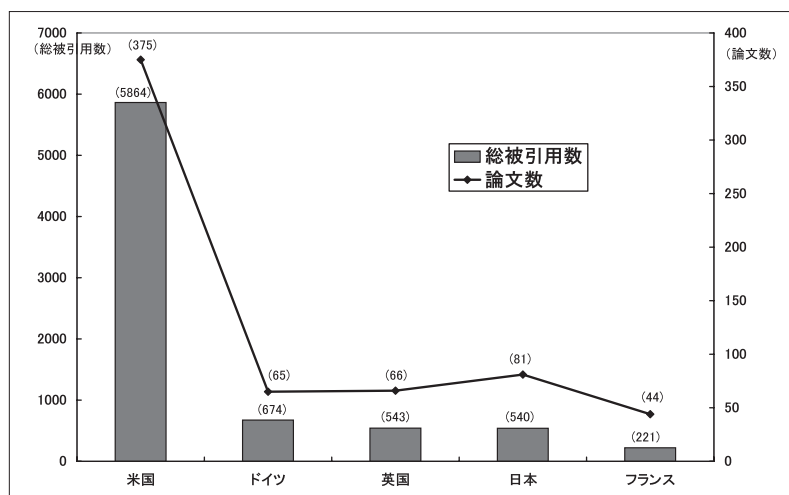
遺伝子サイレンシング研究の国際比較

Thomson Scientific 社の報告によると、遺伝子サイレンシング (gene silencing) を検索キーワードとして、1993 年から 2003 年までの論文を検索した結果、1,505 報の論文が該当し、この研究領域は 4,540 人の著者、48 カ国、365 の学術ジャーナル、898 の研究機関から構成されることが示された¹²⁾ (検索は、論文要旨および著者指定のキーワードを対象としている)。

● 遺伝子サイレンシング研究でトップは米国である

Thomson Scientific 社によると、1993 年から 2003 年までの遺伝子サイレンシング論文の総被引用数の各国比較では、1 位米国 (総被引用数 17,073、論文数 697)、2 位英国 (総被引用数 6,374、論文数 168)、3 位ドイツ (総被引用数 3,166、論文数 128)、4 位フランス (総被引用数 2,460、論文数 117)、5 位スコットランド (総被引

図表 4 遺伝子サイレンシング研究領域の論文の総被引用数の国際比較 (2002 ~ 2003 年)



科学技術動向研究センターにて作成

用数 1,716、論文数 47) であり、日本は 12 位 (総被引用数 649、論文数 111) であることが示された¹²⁾。

● 近年、日本の論文の被引用数は増加している

最近 2 年間の論文の被引用数を国際比較するために、上記の ESI 論文データベースを用いて、同様に論文検索および分析を新たに行った。

図表 4 に、2002 年から 2003 年までの最近 2 年間に発表された論文の総被引用数の国際比較を示した。論文の総被引用数のトップ国は、1993 年から 2003 年までの約 10 年間と同様に米国であることが示された。

一方、最近 2 年間の日本の論文の総被引用数は、ドイツや英国とほとんど変わらないレベルまで躍進していた。また、1993 年から 2003 年までの約 10 年間に発表された論文の内の約 7 割がこの 2 年間に発表されていた。従って、日本では近年になってからこの研究領域が盛んになってきたと考えら

れる。

3 - 2

遺伝子サイレンシング研究領域の特徴

次に遺伝子サイレンシング研究領域の特徴を、ESI 論文データベースを基にして分析する。

● 遺伝子サイレンシング研究領域は複合領域である

遺伝子サイレンシング研究領域の論文を、論文が掲載されたジャーナルの学問領域別に分類すると、全体の 35% が Molecular Biology & Genetics (分子生物学 & 遺伝学)、21% が Plant & Animal Science (植物学 & 動物学)、19% が Biology & Biochemistry (生物学 & 生化学)、13% が Clinical Medicine (臨床医学) であることが示された¹²⁾ (図表 5)。

遺伝子サイレンシング研究領域は、多くの学問分野にまたがる研究領域であることが論文分析により示された。

●被引用数トップ 10 論文における 2 大テーマは DNA メチル化と RNAi である

遺伝子サイレンシング研究において、被引用数のトップの 10 論文を図表 6 に示した。これらの研究内容を大きく分けると、2 つの研究テーマが存在することが分かった。

ひとつの大きなテーマは、RNA による遺伝子サイレンシングのメカニズムの解明であり、もうひとつは、哺乳類細胞における DNA やヒストンのメチル化による遺伝子サイレンシングのメカニズムの解明である。

3 - 3

遺伝子サイレンシング研究領域の変化

遺伝子サイレンシング研究領域の経時的な変化を明らかにするた

めに、前述したデータベースを用いて論文数の分析を行った。

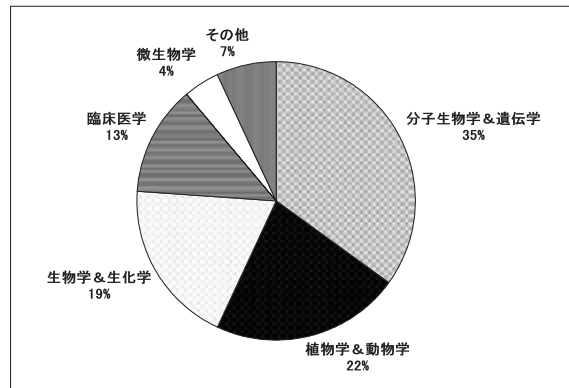
検索キーワードとして「gene silencing (遺伝子サイレンシング)」を用いて、各年の論文数を調べた。1996 年の論文数は僅か 31 報であったが、それ以降、論文数は継続的に増加し、2001 年以降に急増した (図表 7)。

また、前項 3 - 2 で示された遺伝子サイレンシング研究

領域において被引用数の高い研究テーマである「RNA」および「methylation (メチル化)」を、それぞれ「gene silencing (遺伝子サイレンシング)」と組み合わせて検索を行い、各年次における研究領域内における研究内容の変化を調べた (図表 7)。

その結果、1997 年まではメチル化研究が主流であることが示され、2002 年以降からは RNA 研究が主

図表 5 遺伝子サイレンシング研究の論文の学問領域分布



科学技術動向研究センターにて作成

図表 6 被引用数トップ 10 論文

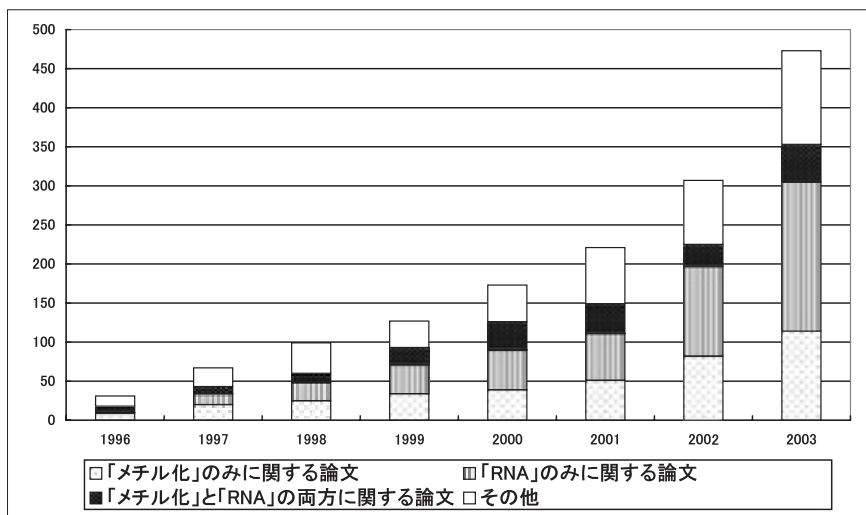
	被引用数	論文名	研究内容	著者名 (所属国)	ジャーナル名 (発表年)
1	913	Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands STATUS OF CPG.	メチル化	Herman, JG 等 (米国)	PNANS (1996)
2	627	Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells.	RNAi	Elbashir, SM (ドイツ)	NATURE (2001)
3	584	Methylated DNA and MECP2 recruit histone deacetylase to repress transcription.	メチル化	Jones, PL (米国、ベルギー、イタリア)	NATURE GENETICS (1998)
4	522	Cancer epigenetics comes of age	エピジェネティクス	Jones, PA (米国)	NATURE GENETICS (1999)
5	411	Methylation of the 5'-CpG island of the P16/CDKN2 tumor-suppressor gene in normal and transformed human tissues correlates with gene silencing.	メチル化	Gonzalezulueta, M (米国)	CANCER RESEARCH (1995)
6	345	A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants.	アンチセンス RNA	Hamilton, AJ (英国)	SCIENCE (1999)
7	339	Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain.	メチル化	Bannister, AJ (英国、スコットランド)	NATURE (2001)
8	308	Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins.	メチル化	Lachner, M (オーストリア)	NATURE (2001)
9	293	An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in Drosophila cells.	RNAi	Hammond, SM (米国、英国)	NATURE (2000)
10	264	RNA interference is mediated by 21-and 22-nucleotide RNAs.	RNAi	Elbashir, SM (ドイツ)	GENES & DEVELOPMENT (2001)

科学技術動向研究センターにて作成

流になっていく傾向が示された。これは、2001 年までに RNA による遺伝子サイレンシングの基本的なメカニズムが解明され、小さな二本鎖 RNA に研究者の関心が集まったためであると考えられる。

また、遺伝子サイレンシングのメカニズムにおいて、「RNA」と「メチル化」は関連があるという報告が 2004 年に相次いでなされており^{13～15)}、別の領域と思われていたこれらの研究領域は、今後、融合していくと推測される。

図表 7 遺伝子サイレンシング研究領域の論文数と研究内容の変遷 (1996 年～2003 年)



科学技術動向研究センターにて作成

4. 疾患治療に向けた遺伝子サイレンシングの応用研究の展開 (2002 年～2004 年)

小さな二本鎖 RNA (siRNA) を利用した医薬品や治療および予防法の開発が期待され、哺乳類細胞やマウスを使った実験が行われている¹⁶⁾。治療の対象として、ウイルス疾患 (HIV / AIDS、インフルエンザ、SARS、肝炎ウイルスなど)、神経疾患 (パーキンソン、アルツハイマーなど)、がん、自己免疫疾患 (リウマチなど) といった、遺伝子の発現を抑制することで治療効果が期待される疾患が検討されている。

図表 8 に、これらの応用研究の展開を可能にしたブレークスルーとなった研究を示した。

図表 8 遺伝子サイレンシング研究 (応用研究) におけるブレークスルー

年	内容	研究対象	注目点
2002 年	小さな二本鎖 RNA をマウスの尾静脈から注入して遺伝子抑制を起こした ¹⁷⁾	マウス	通常の方法での生体へのデリバリーに成功
2003 年	肝炎モデルマウスを用いて小さな二本鎖 RNA による肝炎発症の予防 ¹⁸⁾	マウス	小さな二本鎖 RNA による治療原理の確立
2004 年	RNAi を用いたスクリーニングシステムにより、既知のシグナル伝達経路から新規分子を発見した ¹⁹⁾	ヒト細胞	大規模スクリーニング系の確立により、薬の新しい標的を探索可能になる

科学技術動向研究センターにて作成

グは、細胞が分裂して増えていくことにより、siRNA の細胞に対する絶対量が減じるため、5 日間程度しか効果が持続しない。そのため、治療薬としての実現性が疑問視されていた。しかし、それを打開する研究が 2003 年に実施された²⁰⁾。

HIV ウイルスは、マクロファージの表面にある CCR5 受容体に結合して、マクロファージに内に侵入する。従って、この受容体への結合を阻止すれば HIV ウイルス感染は防ぐことができると考えられた。また、マクロファージは細胞分裂をしないために、siRNA による遺伝子抑制が長期間持続できると期待された。

まず、マクロファージの CCR5

受容体遺伝子の発現を抑制する siRNA と HIV ウイルスの遺伝子の発現を抑制する siRNA が作成され、これらを組み合わせることにより HIV ウイルスの感染を防げるかどうかを実験された。

あらかじめ siRNA をマクロファージに導入して、CCR5 受容体遺伝子の発現を抑制することにより、HIV ウイルスのマクロファージへの感染を防ぐことが出来た。また、HIV ウイルスの遺伝子の発現抑制をする siRNA によって、既に感染したマクロファージ内のウイルスの複製が阻害できることが分かり、予防薬としてだけでなく、治療薬としても期待されることが明らかになった。

4 - 1

遺伝子サイレンシングによる疾患治療研究

以下に、ヒト病態モデル動物を用いた遺伝子サイレンシングの応用研究の例を示す。

● HIV ウイルスの感染阻止

急速に分裂する細胞に対する siRNA による遺伝子サイレンシ

図表 9 miRNA データベース



The miRNA Registry のウェブより

● 肝臓疾患における重症化予防

多くの肝臓疾患では、肝臓に Fas タンパク質を介したアポトーシス（細胞死）が生じていることが知られている。肝細胞が死ぬことにより肝機能が低下し、これが肝硬変などの症状を引き起こす。そのため、Fas タンパク質の発現を抑制することにより、肝細胞死を防ぐことができれば、肝硬変などの重症な病態は生じないと考えられた。

2003 年に自己免疫性の肝炎モデルのマウスを対象にして、siRNA による遺伝子サイレンシングが報告された。Fas 遺伝子に対応する核酸配列を持つ siRNA をマウスの尾静脈から投与した結果、肝炎モデルマウスが肝炎を発症することを防ぐことが出来た¹⁸⁾。

4 - 2

遺伝子サイレンシングによる創薬研究

小さな二本鎖 RNA を薬として用いるのではなく、創薬のための新しい生体内の標的（タンパク質）を探索するためのツールとして用いることが行われている。

● がん治療薬の創薬研究

2003 年に、RNAi を用いて癌関連経路における脱ユビキチン酵素群を調べた結果、今まで機能が知られていなかった家族性円柱腫症腫瘍抑制遺伝子（CYLD）を阻害すると、転写因子である NF- κ B が活性化され、アポトーシス（細胞死）に対して抵抗性になるということが報告された²¹⁾。

つまり、CYLD が失われることにより、細胞死が起こり難くなり、異常な細胞が発生しても排除できないために、遺伝子の変異などが蓄積し、がんを生じるというメカ

ニズムが考えられる。CYLD が失われることと発がんの関係はわかっていたが、CYLD が関与する発がんのメカニズムはわかっていなかった。

この結果から、家族性円柱腫症の患者に対する治療薬として、NF- κ B 阻害剤の研究が行われている。

4 - 3

遺伝子サイレンシング研究を進展させるための基盤整備

小さな二本鎖 RNA に関するデータベースが欧米を中心に構築され、RNAi の塩基配列など情報が提供されている。

● 小さな二本鎖 RNA (miRNA) のデータベース

小さな二本鎖 RNA (miRNA) のデータベースが、英国のサンガー研究所（ウェルカムトラスト）により構築された^{22, 23)}。全体で 899 個の miRNA が既に登録されており、ショウジョウバエ 78 個、線虫（2 種）166 個、ヒト 191 個などのデータを自由に閲覧することができる（図表 9）。

4 - 4

医薬品開発をめぐる動き

今や、遺伝子サイレンシング研究は、応用研究から臨床研究および医薬品開発のフェーズに入りつつある。

● 医薬品開発のために企業主体の技術提携が始まっている

2003 年を中心に米国の大学や企業間の技術提携などが進んでいるので、いくつか例を挙げる。

米国 Sirna Therapeutics 社は、マサチューセッツ大学医学部と小さな二本鎖 RNA (siRNA) 技術のライセンス契約を締結した。

また、製薬大手企業のメルク Merck 社は、Alnylam Holding 社（マサチューセッツ州）と、RNA に基づく技術および医薬品の開発で提携することを発表した。Alnylam Holding 社は、Alnylam 社とドイツの Ribopharma 社との合併会社である。Ribopharma 社は、欧州の RNAi に関する特許を多数保有していたことから、Alnylam 社を通じて米国内で RNAi 関連の特許が押さえられつつある。

さらに、Alnylam 社の製薬部門である Alnylam Pharmaceuticals 社は、RNAi 技術を用いたパーキンソン病の治療薬の開発において、総合病院および研究教育機関

の機能を併せ持つ、全米一の総合医療機関である Mayo Clinic と提携することを発表した。

現時点では、ヒトへ対する siRNA 薬の投与などの臨床研

究（治験）は報告されていないが、近い将来（2004 年の終わりか 2005 年）には開始されるのではないかと推測される。

5. 遺伝子サイレンシング研究において未解決な研究課題

本節では、医療に向けた遺伝子サイレンシング研究において、未解決な研究課題を検討し、そのためにはどのような研究を行わなければならないかを考える。

5 - 1

基礎研究における未解決研究課題

遺伝子サイレンシング研究領域では、基礎研究において短期間にブレークスルー研究が頻発したために、基礎研究は十分になされたかのような印象を受けるが、実はまだわかっていないことが多い。

● RNA 干渉 (RNAi) のメカニズムの解明

図表 2 において、「二本鎖 RNA による遺伝子サイレンシングのメカニズム」を示したが、RISC 複合体の詳細な構造や機能などについては明らかではない部分もあり、今後の研究の進展によりさらに詳細なメカニズムの解明が必要である。

● 小さな二本鎖 RNA (miRNA) の生体内での役割

生体内で様々な遺伝子の発現の調節を行っていることが推定されている小さな二本鎖 RNA (miRNA) は、最近の実験結果から、哺乳類の細胞内に約 250 個存在すると考えられている。

これらの小さな二本鎖 RNA (miRNA) は、発生や分化などの段階や、様々な器官において、遺

伝子の発現の調節を行っていることが推測されている。

遺伝子発現のオン・オフのスイッチのような働きをする miRNA がある。生体内には、他のタンパク質に対して、「抑制」の機能をもつタンパク質がある。このタンパク質の遺伝子の発現を miRNA が抑制すると、「抑制」が外れて、他のタンパク質の機能が「発現」される。

これらの 250 個存在するという miRNA 全ての機能の解明は、生体の遺伝子調節メカニズムと遺伝子と遺伝子のネットワークの解明につながると考えられるが、ほとんどの miRNA について解明はまだ進んでいない。

● 染色体における遺伝子発現抑制と RNAi の関係

正常な染色体には、遺伝子の発現がメチル化により特異的に抑制された領域がある。遺伝子の抑制状態が不安定になると、正常な発生や分化が妨げられたり、がんなどの疾患や先天性の異常などが引き起こされたりすることが知られている。近年、この染色体上の発現抑制に、RNAi のメカニズムが関与していることが示唆されたが、そのメカニズムは不明である。

染色体の遺伝子抑制の状態が調節可能になることは、発生や分化の研究に新しい知見をもたらす、疾患に対する新しい治療薬を生むブレークスルーにつながると考えられるので、このメカニズムの解明は重要である。

5 - 2

医療に向けての応用研究における未解決研究課題

RNAi を用いた医薬品開発に関する市場規模を見積もることは、RNAi 薬がまだ開発されていない現状では難しい。現在、RNAi は、研究上の実験技術や試薬として主に使用されており、市場規模は \$300 million であると思積もられる。これらの技術は、医薬品や治療技術の開発に関連すると考えられるので、従って RNAi を用いた医薬品開発市場の価値は、現在は \$500 million であると思積もられる。2010 年までには \$1 billion にまで拡大すると予測されている²⁴⁾。

しかし、医薬品としての実用化を考えた場合、解決しなければならない多くの研究課題がある。

● 薬物の体内輸送 (DDS) の問題

薬物の体内輸送 (DDS) は重要な問題である。医薬品として使用するためには、通常の方法で投与された siRNA が標的臓器に輸送され、治療効果が得られるまで生体内に安定に存在し、その効果を持続するものでなければならない。

生体内に siRNA を輸送する方法として、①リポソームなどの合成高分子を担体として利用、②安全なウイルス性ベクターを担体として利用、などの方法が考えられる。これらの方法は、遺伝子治療研究においても検討されている

が、効率性や安全性において万全の技術には達していない。

今後の新しい DDS 技術として、ナノ粒子を担体とするなどのナノテクノロジーを利用した技術が期待できるかもしれない。

●副作用の問題

選択性の優れた医薬品は、ほとんど副作用を示さないと考えられてきた。しかし、低副作用の分子標的薬として近年開発された医薬品の中でも、特定の患者には激しい副作用を示すものが見つかるなど、遺伝子を標的とした医薬品の場合は、患者のもつ遺伝子の状態と医薬品との組み合わせで予期しない副作用が生じることがある。

また、ヒトゲノムの解読は終了したが、遺伝子と遺伝子の総合的なネットワークがどのように繋がり、どのように生体内で機能しているかなどについては、まだ十分にわかっていない。ある特定の遺伝子の発現を抑えたことで、予想もしなかった別の遺伝子の抑制や発現が引き起こされるかもしれない。

さらに、生体の細胞中には mRNA だけではなく、リボゾーム RNA の生合成を行う核内に存

在する小さな RNA が存在する。細胞内に導入された RNAi 薬が、核内に移行し、これらの核内の小さな RNA を標的として結合する可能性がある²⁵⁾。

5 - 3

医療に向けた 遺伝子サイレンシングを 進展させる研究

遺伝子サイレンシングを利用した医薬品は、遺伝子に直接的又は間接的に作用するという特徴をもつ。従って、これらの医薬品も安全かつ効果的に使用するには、生体内の主要な遺伝子の機能、発現の調節メカニズム、遺伝子間の相互関係のネットワークなどを理解する必要がある。

そのための研究として考えられるものを以下に示す。

(1)モデル生物を用いた基礎研究

生命現象に関わる遺伝子の機能などは、全ての生物において基本的に共通であるので、ヒトのモデル生物を用いて詳細な研究が行われることが、ヒトにつながる研究成果を生むと考えられる。

線虫やショウジョウバエなどの十分に研究が進んでいるような実験生物においても、まだこれらを「生物」として機能させている、遺伝子を含めた生体機能の解明には至っていない。

(2)課題解決型の基礎研究

医療に向けた遺伝子サイレンシング研究を進展させるためには、応用研究や臨床研究から出てきた研究課題を解決していくことが重要である。そのためには、課題解決型の基礎研究の実施が必要であると考えられる。

(3)ニーズに対応した応用研究と臨床研究

遺伝子サイレンシングの医療への応用を考える時に、どのような患者が存在し、患者がどういうことを希望し、どのケースに遺伝子サイレンシングの医療を適応できるかの情報が必要であると考えられる。

臨床の現場のニーズに対応した、応用研究や臨床研究の実施が必要であり、そのためには、医療情報が研究者に伝達しやすいシステムの構築が重要である。

6. おわりに

遺伝子サイレンシング研究領域の特徴を分析し、当該領域をさらに進展させるための方策を検討する。

6 - 1

本領域の特徴

本領域の特徴は以下の3点であると考えられる。

●遺伝子サイレンシング研究は 複数の研究領域が融合する ことにより発展している

遺伝子サイレンシング研究領域は、ここ4～5年間で急速に発展

図表 10 遺伝子サイレンシング研究の研究フェーズ

研究のフェーズ	年	期間	研究内容
最初の報告	1990 年	(8 年間)	遺伝子サイレンシング現象の初の報告
基礎研究	1998 年から 2001 年	4 年間	生体の遺伝子サイレンシングのメカニズムの解明
応用研究	2002 年から 2004 年	3 年間	疾患モデル生物を用いた治療に向けた研究
臨床研究	2005 年から ?	?	患者に対する臨床治験に関する研究

科学技術動向研究センターにて作成

した領域である。DNA メチル化や RNA による遺伝子抑制など複数の基礎研究領域が融合して領域を拡大した。また、最初の研究対象は植物であったが、酵母、線虫

など対象を広げ、現在はマウスなどの哺乳類からヒトの疾患治療へと研究対象を移している。

●研究フェーズの移行速度が速い

生物医学研究は、多くの場合、基礎研究から応用研究、さらに臨床研究へと研究フェーズを移すと考えられる。本領域は、基礎研究、応用研究、臨床研究の各フェーズへと移行するスピードが非常に速い（図表 10）。

●米国が先行している研究領域であるが、近年、日本の研究者による論文の被引用数が増加している

論文分析から、本領域を先導しているのは米国であると考えられる。しかし、日本の研究者による論文の被引用数が近年、急増していることから、日本においても遺伝子サイレンシング研究規模が拡大していると推測される。

2002～2003 年に発表された論文において、インパクトファクターが 10 以上のトップジャーナルに掲載された論文の内、日本人研究者が研究責任者である論文を支援した研究費支援制度をみると、「21 世紀 COE（文部科学省）」、「科研費 特定領域研究（文部科学省）」、「科研費 基盤研究(S)（文部科学省）」、「未来開拓学術研究（JSPS）」、「戦略的創造研究推進事業（JST）」、「イネゲノムプロジェクト（農林水産省）」など、比較的大型なプロジェクト型の研究支援制度によるものが多いことがわかった。

6 - 2

遺伝子サイレンシング研究領域をさらに進展させる方策

研究領域の特徴を踏まえて、当該領域をさらに進展させる方策を検討する。

(1)スパイラル型の研究領域には課題解決型の基礎研究の開始が重要

遺伝子サイレンシング研究は、基礎研究から生じたブレークスル

ーが、医療へと向かう応用研究の方向性をつくったと考えられる。現在、遺伝子サイレンシング研究の進展により、生命現象に関しての多くのことがわかってきたが、まだ解明されていない生体内の機能やメカニズムは多い。特に、発生や分化の過程における遺伝子の発現調節などの生物としての共通のメカニズムは、よくわかっていない。

さらに、医療上でこの技術を使用するためには、解決しなければならない多くの研究課題がある。これらの課題の解決は、応用研究や臨床研究だけでなく、遺伝子ネットワークの解明などの基礎研究の実施も必要であると考えられる。

従って、遺伝子サイレンシング研究領域は、「基礎研究→応用研究→臨床研究」というリニア型の研究モデルによって進展するのではなく、「基礎研究→応用研究→臨床研究→基礎研究→応用研究→臨床研究→」というスパイラル型の研究モデル、又は、「基礎研究」「応用研究」「臨床研究」が三本柱として絡み合いながら進んでいくという組み紐型の研究モデル、によって進展する研究領域であると考えられる。

現在は、スパイラルの最初の 1 周目の終点が見えつつある段階において、2 周目のスパイラルに移行するには、課題解決型の基礎研究の開始が重要になると考えられる。

(2)別の領域の研究を自然に取り込めるような場の構築が必要

遺伝子サイレンシング研究が、初めは植物研究からスタートしたように、研究領域を拡大するようなブレークスルーは、他の領域の研究を取り入れることから発生する。従って、他の研究領域との情報交換が容易にできるような研究環境が必要である。

具体的には、Funding Agency が課題解決型の研究テーマを設

定して公募し、異なる研究アプローチをとる、異なる研究領域に属するグループを約 10 グループ採択し、年間 2 回程度の中間発表会を開催し研究成果の情報交換を行う。グループ間の共同研究を強制することではなく、グループ間の情報交換のみを促進させる。

また、運営委員会が参加者をあらかじめ選別した上で、特定の研究課題を合宿スタイルかつクローズドで徹底的に討論し合うという、ゴードン会議のような研究会合を異分野の研究者を集めて開催することも効果的かもしれない。

参考文献

- 1) Egger, G., et al. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 429, 457 - 463 (2004)
- 2) van der Krol, AR, et al. Flavonoid genes in *Petunia*: Addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell* 2, 291 - 299 (1990)
- 3) Napoli, C., et al. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell* 2, 279 - 289 (1990)
- 4) Rosenberg, UB., et al. Production of phenocopies by Kruppel antisense RNA injection into *Drosophila* embryos. *Nature* 313, 703 - 706 (1985)
- 5) Fire, A., et al. Potent and specific genetic interference by double-strand RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806 - 811 (1998)
- 6) Montgomery, MK., et al. RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 95, 15502 - 15507 (1998)

- 7) Bernstein, E., et al. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409, 363 - 366 (2001)
- 8) Billy, E., et al. Specific interference with gene expression induced by long, double-stranded RNA in mouse embryonal teratocarcinoma cell lines. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 98, 14428 - 14433 (2001)
- 9) Elbashir, SM., et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494 - 498 (200)
- 10) Lagos-Quintana, M., et al. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 294, 853 - 858 (2001)
- 11) Hood, E. RNAi: What's all the noise about gene silencing? *Environmental Health Perspectives* 112, A225 - A229 (2004)
- 12) Thomson (ISI) 社, Special Topics, Gene Silencing. <http://www.esi-topics.com/genesil/index.html> (2003)
- 13) Fedoriw, AM., et al. Transgenic RNAi reveals essential function for CTCF in H19 gene imprinting. *Science* 303, 238 - 240 (2004)
- 14) Pal-Bhadra, M., et al. Heterochromatic silencing and HP1 localization in *Drosophila* are dependent on the RNAi machinery. *Science* 303, 669 - 672 (2004)
- 15) Chan, S., et al. RNA silencing genes control de novo DNA methylation. *Science* 303, 1336 (2004)
- 16) Dorsett, Y and Tuschl, T. siRNA: Applications in functional genomics and potential as therapeutics. *Nature* 3, 318 - 329 (2004)
- 17) Lewis DL, et al. Efficient delivery of siRNA for inhibition of gene expression in postnatal mice. *Nature Genetics* 32, 107 - 108 (2002)
- 18) Song, E., et al. RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nature Medicine* 9, 347 - 351 (2003)
- 19) Berns, K., et al. A large-scale RNAi screen in human cells identifies new components of the p53 pathway. *Nature* 428, 431 - 437 (2004)
- 20) Song, E., et al. Sustained small interfering RNA-mediated human immunodeficiency virus type 1 inhibition in primary macrophages. *Journal of Virology* 77, 7174 - 7181 (2003)
- 21) Brummelkamp, TR., et al. Loss of the cylindromatosis tumour suppressor inhibits apoptosis by activating NF- κ B. *Nature* 424, 797 - 801 (2003)
- 22) Griffiths-Jones, S. The microRNA registry. *Nucleic Acids Research*, 32, D109 - D111 (2004)
- 23) The miRNA Registry : <http://www.sanger.ac.uk/Software/Rfam/mirna/index.shtml>
- 24) Thomson 社, News MICROMEDEX, Research and Markets/RNAi Market/Estimated to be \$300 million and expected increase to \$850 million by the year 2010. http://www.micromedex.com/news/?story_ID=18787&category=4
- 25) Pederson, T. RNA interference and mRNA silencing, 2004: How far will they reach? *Molecular Biology of the Cell* 15, 407 - 410 (2004)

.....